世界知的所有権機関

PCT

国際事務局



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(11) 国際公開番号 WO 92/21764 (51) 国際特許分類 5 C12P 7/24, C12N 1/16 A1 (43) 国際公開日 1992年12月10日(10.12.1992) (21)国際出願番号 PCT/JP92/00722 (81) 指定国 1992年6月4日(04.06.92) AT(欧州特許), BE(欧州特許), CA, CH(欧州特許), (22) 国際出願日 DE(欧州特許), DK(欧州特許), ES(欧州特許), FR(欧州特許), GB(欧州特許), GR(欧州特許), IT(欧州特許), JP, (30) 優先権データ 1991年6月6日(06.06.91) JΡ LU(欧州特許), MC(欧州特許), NL(欧州特許), SE(欧州特許), 特顏平3/134750 US. (71) 出願人(米国を除くすべての指定国について) 添付公開郡類 国原調査報告屯 協和屈群工業株式会社 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.)[JP/JP] 〒100 東京都千代田区大手町1丁目6番1号 Tokyo, (JP) (72) 発明者;および (75) 発明者/出願人(米国についてのみ) 久我哲郎(KUGA, Tetsuro)[JP/JP] 〒747 山口県防府市協和町2-2-305 Yamaguchi, (JP) 井上 皷(INOUE, Makoto)[JP/JP] 〒747 山口県防府市自由ヶ丘1-3-6 Yamaguchi, (JP) 井村聡明(IMURA, Toshiaki)[JP/JP] 〒747 山口県防府市協和町1-2 Yamaguchi, (JP) 青山良秀(AOYAMA, Yoshihide)[JP/JP] 〒747 山口県防府市協和町2-2-101 Yamaguchi, (JP) 倉都祥行(KURATSU, Yoshiyuki)[JP/JP] 〒747 山口県防府市協和町2-2-302 Yamaguchi, (JP)

- (54) Title: PROCESS FOR PRODUCING ASTAXANTHIN BY FERMENTATION
- (54) 発明の名称 発酵法によるアスタキサンチンの製造法
- (57) Abstract

A process for producing astaxanthin industrially efficiently at a low cost by culturing a microorganism which belongs to the genus *Pfaffia*, is resistant to at least one of citronellol, primaquine and hydroxydiphenyl and can produce astaxanthin in a medium.

(57) 要約

本発明方法によると、ファフィア属に属し、シトロネロール、プリマキンおよびヒドロキシディフェニールの少なくとも一種に耐性を有し、かつアスタキサンチン生産能を有する微生物を培地に培養することによりアスタキサンチンを工業的に安価に効率よく製造することができる。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のハンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AT オーストート AU オースパート BB ハルバートト BB ハルバーート BG ハル・ナー・ファ BG アル・カナンル CF 中央アコス・ジース CH フェンスートルコンパー CM チェインス CI コンメートルコンパー CM チェインマイン CM チェインマイン DE ドテス、フ ES ス、 ≢'.

1

明 細 書

発酵法によるアスタキサンチンの製造法

技術分野

本発明は発酵法によるアスタキサンチンの製造法に関する。アスタキサンチンは天然カロチノイドの一種であり、養殖魚類の色調改善剤として有用である。

従来の技術

従来、ファフィア属微生物を用いるアスタキサンチンの製法として は、例えば、ファフィア属に属し、アンチマイシンA感受性を有する 微生物を用いる方法 (Applied and Environmental Microbiology, 55, 116(1989))、ファフィア属に属し、 β -イオノン耐性を有する微生 物を用いる方法 (同誌, 56, 2944(1990))、ファフィア・ロドチーマ ATCC24202 を用いる方法(特公昭63-61907号公報)、ファフィア属微 生物をエチルメタンスルホネート、UV照射またはN-メチル-N'-ニトローN-ニトロソグアニジンで変異処理した変異株を用いる方法 (特表平2-504101号公報(₩0 88/08025) ファフィア属に属し、ゲラニ オールに耐性を有する微生物を用いる方法〔特開平3-206880号公報 (EP 427405))、ファフィア属に属し、抗生物質(アンチマイシン、 ツニカマイシン、ニスタチン)、チトクローム B 阻害剤(アンチマイ シン、2-n-ヘプチル-4-ヒドロキシーキノリン-N-オキシド) またはテルペノイド合成経路阻害剤(メバロン酸ラクトン)耐性を有 する微生物を用いる方法 [特表平4-501053号公報(WO 90/01552)]等 が知られている。

発明の開示

本発明によると、ファフィア属に属し、シトロネロール、プリマキンおよびヒドロキシディフェニールの少なくとも一種に耐性を有し、かつアスタキサンチン生産能を有する微生物を培地に培養し、培養物からアスタキサンチンを採取することにより、アスタキサンチンを工

業的に安価に効率よく製造することができる。

また、本発明はファフィア属に属し、シトロネロール、プリマキンおよびヒドロキシディフェニールの少なくとも一種に耐性を有し、かつアスタキサンチン生産能を有する微生物の培養物、菌体または菌体処理物を提供する。

本発明における菌体処理物としては、菌体の機械的摩砕処理物、超音波処理物、溶媒処理物、酵素処理物、界面活性剤処理物、乾燥処理物等があげられる。

本明細書において、シトロネロール、プリマキンまたはヒドロキシティフェニールに耐性とは、シトロネロール 220 μg/ml、プリマキン3.9 g/l またはヒドロキシティフェニール33 μg/mlに生育できることを意味する。

本発明に用いられる微生物としては、ファフィア属に属し、シトロネロール、プリマキンおよびヒドロキシディフェニールの少なくとも一種に耐性を有し、かつアスタキサンチン生産能を有するものであればいずれも用いられる。それらの菌株はファフィア属のアスタキサンチン生産菌を通常の変異手段〔例えば、紫外線照射、変異誘導起剤処理(NーメチルーN'ーニトローNーニトロソグアニジン等)等〕により変異させた後、シトロネロール、プリマキンまたはヒドロキシディフェニールを含有する培地上で生育する菌として得ることができる。その微生物の例としては、ファフィア・ロドチーマH-826

rhodozyma) に属する微生物、例えば、ファフィア・ロドチーマH-8264 (以下、H-8264株という)、同H-8434(以下、H-8434株という)、同H-8435(以下、H-8435株という)等があげられる。

以下に前記変異株の具体的取得方法について示す。

親株としてファフィア・ロドチーマATCC24202(以下、ATCC24202 株という)を用い、該菌株をメタンスルホン酸エチル0.02ml/mlで22℃、60分間処理した後、親株が生育阻害を示す濃度(220μg/ml)のシトロ

ネロールを含む最小培地寒天平板(グルコース20g/1、ディフコ社製 yeast Nitrogen Base 7g/1、寒天20g/1)上に塗布した。 22° で、 $7\sim10$ 日間培養後、生育してくる変異株のうち、250ml容三角フラスコでの液体培養試験で親株よりアスタキサンチンの生産能が優れている菌株を選んだ。そのうち特に優れている株としてH-8264株を得た。

また、シトロネロールの代わりにプリマキン(3.9g/1)およびヒドロキシティフェニール (33㎏/ml) を用いる以外は前記の方法と同様に行って得られた菌株のうち、特にアスタキサンチンの生産性の優れた菌株として、それぞれH-8434株およびH-8435株を得た。

これら変異株の耐性の確認は次の様にして行った。

変異株(H-8264株、H-8434株およびH-8435株)と親株(ATCC24202株)を第1~3表に示す濃度の添加物を含む最小培地寒天平板に塗布し、22℃で培養した。その結果を第1~3表に示す。

第 1 表

シトロネロール	菌	株	
(μg / ml)	ATCC24202	H-8264	
無 添 加 2 0 0 2 2 0	+ + -	+ + +	

第 2 表

プリマキン	菌	株
(g/l)	ATCC24202	H-8434
無 添 加 3.9 6.5	+	+ + +

第 3 表

ヒドロキシディフェニール	菌	株
(μg/ml)	ATCC24202	H-8435
無 添 加 3 0 3 3	+ + -	+ + +

注) + : 生育する ± : わずかに生育する - : 牛音しない

前記3株はブタベスト条約に基づき、H-8264株は平成3年5月18日付で、H-8434株とH-8435株は平成4年3月13日付で、それぞれ工業技術院微生物工業技術研究所に国際寄託され、それぞれFERM BP-3404、3800および3801の寄託番号が付与されている。

本発明に用いる培地としては、炭素源、窒素源、無機塩、生育因子 等を程よく含有する培地ならば合成培地または天然培地のいずれでも よい。

炭素源としては、グルコース、フラクトース、シュクロース、糖蜜等が用いられる。窒素源としては、アンモニア、硫酸アンモニウム、ペプトン、酵母エキス、コーンスティブリカー等が用いられる。無機塩としては、リン酸一カリウム、リン酸ニカリウム、リン酸マグネシウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、塩化カルシウム等が用いられる。生育因子としては、ビタミン、アミノ酸、核酸関連物質等が用いられる。

培養はバッチ培養、連続培養等が用いられ、温度15~35℃好ましくは20~25℃、pHは 3~8、好ましくは 4~6 で行われ、通常 2~7 日間で終了する。培地のpHは炭酸カルシウム、無機または有機の酸、アルカリ溶液、アンモニア、pH緩衝液(例えば、フタル酸水素カリウム)などによって調整される。

培養終了後、培養液から菌体(アスタキサンチン含有)またはアスタキサンチンを得るには、例えば、培養終了後、菌体を分離して、そ

れを乾燥粉砕し乾燥菌体を得るか、培養液から菌体を分離し、破砕した後、該破砕菌体からアスタキサンチンを溶媒抽出し、シリカゲルクロマトグラフィーで処理して得る。

本発明によって得られたアスタキサンチン、前記微生物の培養物、 菌体、菌体処理物等は魚類、甲殻類の餌料に用いられる。

発明を実施するための最良の形態

以下に実施例を示す。

実施例1

H-8264株、H-8434株およびH-8435株をそれぞれ試験管中の下記組成からなる種培地 8 mlに植菌した後、22℃で 3 日間培養した。

種培地組成:グルコース 10g/l、酵母エキス 3g/l、ペプトン5g/l、肉エキス 3g/l(pH 5.0、KOH で調整、 120℃で20分間加圧蒸気殺菌)

得られた3つの種培養液3mlをそれぞれ250ml容三角フラスコ中の下記組成からなる生産培地30mlに植菌し、22℃で4日間培養した。

生産培地組成:グルコース30g/1、硫酸アンモニウム 2g/1、酵母エキス 2g/1、KH₂PO₄ 1g/L、MgSO₄・7H₂O 0.5g/1、CaCl₂・2H₂O 0.1g/1、フタル酸水素カリウム20.4g/1(pH5.0、KOH で調整、 120℃で20分間加圧蒸気殺菌)

その結果、H-8264株、H-8434株およびH-8435株の培養液中のアスタキサンチン生成量はそれぞれ 5.8 mg/l 、 5.5 mg/lおよび 4.7 mg/l であった。

一方、対照として、親株ATCC24202 株を用い、前記と同様に培養した結果、培養液中のアスタキサンチン生成量は 3.3 mg/l であった。 実施例 2

H-8264株を2リットル容三角フラスコの実施例1に示した種培地 300 mlに植菌した後、22℃で3日間培養した。得られた種培養液300 mlを5リットル容培養槽中の実施例1に示した生産培地からフタル酸 水素カリウムを除いた培地 3 リットルに植菌した後、22℃で48時間培養 (回転数600rpm、通気量 3 リットル/min)した。培養中のpHは、アンモニア水で 5 に調整した。その結果、培養液中のアスタキサンチン生成量は17.1 mg/l であった。

この培養液から菌体を分離した後、ホモゲナイザーにて菌体を破砕した。該破砕菌体からアスタキサンチンをアセトンにて抽出し、減圧濃縮後、シリカゲルクロマトグラフィー(溶出液;アセトン:石油エーテル〔1:19v/v〕→アセトン:石油エーテル〔1:4 v/v〕の濃度勾配)によりアスタキサンチン32嘘を得た。

実施例3

H-8434株を2リットル容三角フラスコ中の実施例1に示した種培地300 mlに植菌し、22℃で3日間培養した。得られた種培養液80mlを2リットル容培養槽中の実施例1に示した生産培地からフタル酸水素カリウムを除いた培地720mlに植菌し、22℃で48時間培養(回転数900rpm、通気量0.8リットル/min)した。培養中のpHは、アンモニア水で5に調整した。その結果、培養液中のアスタキサンチン生成量は16.3mg/1であった。

この培養液から菌体を分離した後、スプレー式乾燥機で乾燥することにより、14gのアスタキサンチンを含む37gの乾燥菌体を得た。

PCT/JP92/00722

7

請求の範囲

- (1) ファフィア属に属し、シトロネロール、プリマキンおよびヒドロキシディフェニールの少なくとも一種に耐性を有し、かつアスタキサンチン生産能を有する微生物を培地に培養し、培養物中にアスタキサンチンを生成蓄積させ、該培養物よりアスタキサンチンを採取することを特徴とする発酵法によるアスタキサンチンの製造法。
- (2) ファフィア属に属し、シトロネロール、プリマキンおよびヒドロキシディフェニールの少なくとも一種に耐性を有し、かつアスタキサンチン生産能を有する微生物の培養物、菌体または菌体処理物。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/JP92/00722

A Cocument of the best of the art which is not considered to be of particular plants and in a document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance. The Sur, A, 90/1552 (Igene Biotechn INC.), February 22, 1990 (22. 02. 90), & EP, A1, 436562 & NO, A, 90/1586 A WO, A2, 90/1552 (Igene Biotechn INC.), February 22, 1990 (22. 02. 90), & EP, A1, 436562 & NO, A, 90/1586 Cacument defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance to the definition of the considered to be of particular relevance to the state of the mental state of the state of the mental state of the state state of the state state of the mental state of the state state of t	1 61 55			International Application No PCT	/0192/00/22
II. FIELDS SEARCHED Minimum Documentation Searched Classification System Classification Symbols IPC					
Classification System Classification of Documental Turn this Indication, where appropriate, of the relevant passages 12 Relevant to Claim Relevant of Documental Turn the Indication, where appropriate, of the relevant passages 12 Relevant to Claim Relevant of Claim Relevant passages 13 Relevant to Claim Relevant passages 14 Relevant to Claim Relevant passages 15 Relevant to Claim Relevant passages 15 Relevant to Claim Relevant passages 16 Relevant to Claim Relevant passages 17 Relevant to Claim Relevant passages 18 Relevant to Claim Relevant passages 19 Relevant passages 19 Relevant to Claim Relevant passages 19 Relevant to Claim Relevant passages 19 Relevant to Cl		_			
Classification System Documentation searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are included in the Fields Searched Biosis System Citation of Document, "I with Indication, where appropriate, of the relevant passages " Relevant to Claim R	Int.	C1	C12P7/24, C12N1/16		
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documenta are included in the Fields Searched ** Biosis System Biosis System	II. FIELDS	SEARCH		ntation Searched ⁷	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are included in the Fields Searched. Biosis System III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	Classification	on System		Classification Symbols	
Biosis System Biosis System	IPC				
Category* Citation of Document, "I with Indication, where appropriate, of the relevant passages 12 Relevant to Claim A					
Category Citation of Document, ¹¹ with Indication, where appropriate, of the relevant passages ¹² Relevant to Claim A WO, A2, 91/2060 (Igene Biotechn INC.), February 21, 1991 (21. 02. 91), & AU, A, 9055385 A EP, A1, 427405 (Enzymatix LTD.), May 15, 1991 (15. 05. 91), & NO, A, 90/4447 & JP, A, 3-206880 A WO, A2, 90/1552 (Igene Biotechn INC.), February 22, 1990 (22. 02. 90), & EP, A1, 436562 & NO, A, 90/1586 & DK, A, 90/865 *Special categories of cited documents: ¹⁰ "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date of the considered to be of particular relevance or active focument but published on or after the international filing date of the considered in the priority claim or other specified) "C" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is clied to establish the publication date of another cliation or other specified) "C" document or the relative for the publication date of another cliation or other specified or document or the relative for each of the considered in the considered of the considered of the considered of the considered to involve an inventive step when the decoment of the means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed IV. CERTIFICATION T=2 T	Bios	sis Sy	stem		
Special categories of cited documents: 10 **Special categories of cited documents: 10 **WO, A2, 90/1552 (Igene Biotechn INC.), 1-2 May 15, 1991 (15. 05. 91), & NO, A, 90/4447 & JP, A, 3-206880 **A WO, A2, 90/1552 (Igene Biotechn INC.), 1-2 February 22, 1990 (22. 02. 90), & EP, A1, 436562 & NO, A, 90/1586 *DK, A, 90/865 **DK, A, 90/865 **I' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance earlier document burbuilsed on or after the international filing date and not in conflict with the application but understand the principle or the document of particular relevance; the claimed inventor which is cited to establish the publication date of another which is cited to establish the publication date of another or other special reason (as specialled) "C" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed TV. CERTIFICATION **T later document published after the international filing not considered to inventor priority date and not in conflict with the application but with the special reason (as specialled) **T later document published after the international filing and the priority date and not in conflict with the application but with the document of particular relevance; the claimed inventor become or considered to involve an inventor step when the determinents are particular and the priority date claimed TV. CERTIFICATION **T later document published after the international filing and the notice of the special considered to inventor experience inventor become or considered to involve an inventor step when the determinents and the priority date claimed inventor of the special considered to involve an inventor step when the determinents and the priority date claimed inventor of the special considered to involve an inventor step when the determinents and the priority date claimed inventor of the special considered to involve an inventor step when the determinents and the priority date claimed inventor of	III. DOCU	MENTS C	ONSIDERED TO BE RELEVANT 9		
*Special categories of cited documents: 10 *WO, A2, 90/1552 (Igene Biotechn INC.), February 22, 1990 (22. 02. 90), EP, A1, 436562 & NO, A, 90/1586 *DK, A, 90/865 *Tile and counant defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance in the considered to be of particular relevance in the considered to be of particular relevance in the considered to be of particular relevance which is clied to establish the publication date of another collision or other special reason (as specified) *Counant member of the same patent family occument published after the international filing date or considered to be of particular relevance; the claimed invention be considered to not involve an inventive step when the de is combined with one or more other such document of considered to he of particular relevance; the claimed invention or other special reason (as specified) **Counant published prior to the international filing date but later than the priority date and not in conflict with the application but not or more other such document which may throw doubts on priority claim(s) or which is clied to establish the publication date of another considered to not involve an inventive step when the de is combined with one or more other such document tater than the priority date claimed **Counant member of the same patent family inventions and the priority date claimed inventions and the priority date claimed inventions and the priority date and not in conflict with the application but not understand the principle or theory underlying the inventions and the priority date and not in conflict with the application but not considered to not inconflict with the application but not considered to not inconflict with the application but not considered to not inconflict with the application but not considered to not inconflict with the application that the priority date and not in conflict with the explication that the priority date and not in conflict with the application to considered to not inconfl	Category • \				Relevant to Claim No. 13
*Special categories of cited documents: 10 *Special categories of cited documents: 10 *A	. A	Febr	uary 21, 1991 (21. 02		1-2
*Special categories of cited documents: 10 *Special categories of cited documents: 10 *A DK, A, 90/865 *T" *A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published after the international filing date but later than the priority of the international filing date but later than the priority of the international filing date but later than the priority of the international filing date but later than the priority of the international filing date but later than the priority of the international filing date but later than the priority of the international filing date but later than the priority of the international filing date and not in conflict with the application but understand the principle or theory underfying the inverse comment of particular relevance; the claimed inventior be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the do is combined with one or more other such document combinations to a preson skilled in the a document member of the same patent family IV. CERTIFICATION	A	May	15, 1991 (15. 05. 91)	,	1-2
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance earlier document but published on or after the international filing date document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed IV. CERTIFICATION	A	Febr & EP	uary 22, 1990 (22. 02, A1, 436562 & NO, A,	2. 90),	1-2
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another clatition or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed IV. CERTIFICATION "E" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance; the claimed invention be considered to involve an inventive step when the document of particular relevance; the claimed invention be considered to involve an inventive step when the document of particular relevance; the claimed invention be considered to involve an inventive step document with one or more other such document combination being obvious to a person skilled in the a document member of the same patent family IV. CERTIFICATION					
	"A" docur consi "E" earlie filling "L" docur which citatic "O" docur other "P" docur later t	ment definitioned to be a comment which is cited to be on or other ment referringens ment publishan the pri	ng the general state of the art which is not a of particular relevance to but published on or after the international a may throw doubts on priority claim(s) or a establish the publication date of another special reason (as specified) and to an oral disclosure, use, exhibition or hed prior to the international filing date but ority date claimed	priority date and not in conflict wit understand the principle or theory document of particular relevance; be considered novel or cannot to inventive step document of particular relevance; be considered to involve an inventis combined with one or more ocombination being obvious to a personal principle.	h the application but cited to r underlying the invention the claimed invention canno the considered to involve are the claimed invention canno ther such documents, such erson skilled in the art
				Date of Mailing of this International Se	earch Report
August 26, 1992 (26. 08. 92) September 14, 1992 (14. 09.				•	•
International Searching Authority Signature of Authorized Officer	Internationa	l Searching	Authority	Signature of Authorized Officer	
Japanese Patent Office	Japa	nese :	Patent Office		

国際調査報告

国際出願番号PCT/JP 9 2 / 0 0 7 2 2

	·		
1. 発	明の属する分野の分類		
国際特許分類 (IPC) Int。Cℓ			
<u> </u>	C12P7/24, C	12N1/16	
	01211/24, 0		
пя	祭閲査を行った分野		
п. ы.		た 最 小 限 資 料	
分類		類記号	
T	PC C12P7/24-7/3	8. C12N1/16	
_			
•		·	
	虚小限資料以外の資	料で調査を行ったもの	
В	osis System		
	•		
m Mai	連する技術に関する文献		
引用文献の カテゴリー ※		LAN TORRESTORE	54 b - 47 m
カナゴリー **	引用文献名 及び一部の箇所が関連する	とされ、七の関連する箇所の表示	請求の範囲の番号
A	WG, A2, 91/2060(Ige	ne Biotechn INC	1-2
	21. 2月. 1991(21. 02.		1 2
	&AU, A, 9055385	/,	
A	EP, A1, 427405 (Enzy	matix LTD.)	1-2
	15. 5月. 1991(15. 05.	91),	
	&NO, A, 90/4447&JP,	A, 3-206880	
.	WO 40 00 (1550 (T	D	
A	WO, A2, 90/1552(Ige		1 – 2
	22. 2月. 1990(22. 02. &EP, A1, 436562&NO,		
	&DK, A, 90/865	A, 50/1300	
	a D R, R, 5 0 / 5 0 0		
i			
	·	İ	j
	***		 -
※引用文献のカテゴリー 「T」国際出願日又は優先日の後に公表された文献であって出 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解			
「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの のために引用するもの			
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新			
(理由を付す) 「Y!特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の			
「0」口頭による関示、使用、展示等に含及する文献 文献との、当業者にとって自明である組合せによって進			
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の 歩性がないと考えられるもの 日の後に公表された文献 「&」同一パテントファミリーの文献			
N. 認 証			
国際調査を完了した日 国際調査報告の発送日 26.08.92			
		1 4.0	9.92
国際調査機関	9	権限のある職員	4 B 8 1 1 4
FI 7	本国特許庁(ISA/JP)	│ │特許庁審査官 ※ ★ ★	1 1 1
<u> </u>	FERMENT (BOA/JI)	村	理子(記)
			717